家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白的原核表达及间接免疫荧光定位分析

党晓群[1,#], 林立鹏[2,#], 李春峰[2], 潘国庆[2], 李　田[2], 龙梦娴[2], 周泽扬[1,2,*]

(1. 重庆师范大学动物生物学重点实验室,重庆 401331; 2. 西南大学,家蚕基因组生物学国家重点实验室,重庆 400716)

摘要:【目的】家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* ADP/ATP 转运蛋白可能参与搬运宿主细胞的能量。本研究克隆家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白基因,并进行原核表达、抗体制备及间接免疫荧光定位,为控制和防治家蚕微粒子病提供理论基础。【方法】通过同源序列比对鉴定家蚕微孢子虫 *N. bombycis* ADP/ATP 转运蛋白序列,采用生物合成的方法将编码 3 段面向膜内侧肽段的核酸序列拼接合成,在其两端引入 *Bgl* Ⅱ 和 *Sal* Ⅰ 酶切位点,克隆至 pUC57 载体并测序,再亚克隆至含有二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)标签的表达载体 pQE40 中,然后利用 *Bam*H Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 酶切获得含有 DHFR 标签的重组序列,并连接至 pET30a(+)载体中进行诱导表达。通过 SDS-PAGE、镍柱亲和层析和免疫印迹法鉴定表达蛋白,利用间接免疫荧光对 ADP/ATP 转运蛋白的分布进行检测。【结果】家蚕微孢子虫的 ADP/ATP 转运蛋白编码序列(GenBank 登录号为 EOB13854.1)全长1 524 bp,编码蛋白含有 507 个氨基酸残基,预测分子质量为 59 kDa,等电点为 9.35。具有 12 个跨膜结构域和 TLC 结构域,其中 TLC 结构域含有 4 个功能保守位点。与蜜蜂微孢子虫的 ADP/ATP 转运蛋白比较,氨基酸序列一致性达 30%。系统进化分析表明微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白聚为一类,具有共同的起源。成功构建了 NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a 原核表达重组质粒,目的基因获得表达,其融合蛋白分子量约为 37 kDa,纯化重组蛋白并制备了多克隆抗体。免疫印迹分析表明,成熟微孢子虫中表达 ADP/ATP 转运蛋白;间接免疫荧光定位结果显示,家蚕微孢子虫孢子 ADP/ATP 转运蛋白定位于孢子质膜上。【结论】本研究将为阻断微孢子虫能量来源,达到控制和防治家蚕微粒子病提供新的思路。

关键词: 家蚕微孢子虫; ADP/ATP 转运蛋白; 原核表达; 免疫印迹; 亚细胞定位

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2014)03-0300-08

Prokaryotic expression and subcellular localization of ADP/ATP carrier protein in microsporidian *Nosema bombycis*

DANG Xiao-Qun[1,#], LIN Li-Peng[2,#], LI Chun-Feng[2], PAN Guo-Qing[2], LI Tian[2], LONG Meng-Xian[2], ZHOU Ze-Yang[1,2,*] (1. Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. The State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract:【Aim】The ADP/ATP carrier protein in microsporidian *Nosema bombycis* may be involved in carrying the energy from host cells to itself. In order to provide the theoretical basis for preventing and controlling the pebrine disease, the gene of *N. bombycis* ADP/ATP carrier protein was cloned and expressed in prokaryocytes. The antibody was prepared and indirect immunofluorescence assay was conducted.【Methods】The nucleotide sequences encoding three segmental peptides inside the membrane were synthesized with *Bgl* Ⅱ and *Sal* Ⅰ sites at both ends (NbADP/ATP-△TM) and cloned into pUC57 vector for sequencing, and the target sequence was further subcloned into pQE40 vector with dihydrofolate reductase (DHFR) tag. The NbADP/ATP-△TM-DHFR was cut by *Bam*H Ⅰ and *Sal* Ⅰ and linked to pET30 vector for prokaryotic expression. The expression product was identified by SDS-PAGE, Ni-NTA affinity chromatography and immunoblotting. Indirect immunofluorescence assay was performed to survey

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270138); 重庆市科委基础与前沿研究一般项目(cstc2013jcyjA0363); 重庆市教委科学技术研究项目(KJ130617)

作者简介: 党晓群, 1983 年生, 重庆人, 讲师, 研究方向为病原微生物学, E-mail: dangxiaoqun@126.com; 林立鹏, 男, 1984 年生, 福建龙海人, 博士, 研究方向为微生物次生代谢与调控, E-mail: linlipeng84@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author, E-mail: zyzhou@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2013-12-23; 接受日期 Accepted: 2014-02-26

the distribution of NbADP/ATP. 【Results】The coding sequence of *nbadp/atp* (GenBank accession no. EOB13854.1) is 1 524 bp in length, encoding a 507-amino acid residue peptide with a calculated molecular weight of 59 kDa and a theoretical pI of 9.35. The ADP/ATP carrier protein of *N. bombycis* contains twelve transmembrane domains and the conserved TLC domain which has four conserved functional sites. Sequences blast analysis showed that the ADP/ATP carrier protein of *N. bombycis* shares 30% amino acid sequence identity with *Nosema ceranae* ADP/ATP carrier protein 2. Phylogenetic analysis placed the *N. bombycis* protein in the same subgroup as the ADP/ATP carrier. The recombinant plasmid NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a was successfully constructed. SDS-PAGE analysis showed that the 37 kDa fusion protein was highly expressed and purified. Anti-NbADP/ATP serum was produced in mice with the purified protein. Immunoblotting result showed that NbADP/ATP was expressed in mature spores. Indirect immunofluorescence localization results revealed that ADP/ATP transporter protein is located in the plasma membrane. 【Conclusion】This study provides a new clue for blocking energy source of *N. bombycis* to control and prevent pebrine disease of the silkworm.

Key words: *Nosema bombycis*; ADP/ATP carrier protein; prokaryotic expression; Western blotting; subcellular localization

微孢子虫是一类专性寄生的“无线粒体”单细胞真核生物,广泛寄生于无脊椎动物和脊椎动物,包括人类。目前已发现有超过 150 个属 1 200 多种(Didier *et al.*, 2005; Scheid, 2007)。家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 是微孢子虫属的典型种(Nageli, 1857),寄生于家蚕引起微粒子病,给蚕业生产造成巨大的经济损失。越来越多研究表明,微孢子虫由具有线粒体的真菌进化而来(Franzen, 2008; Keeling, 2009)。然而,在微孢子虫的超微结构中并没有观察到典型真核生物所具有的能量工厂——线粒体(Embley and Hirt, 1998);微孢子虫也不存在“无线粒体”真核生物(如阴道毛滴虫)所特有的线粒体同源细胞器——氢化酶体(hydrogenosome)(Bui *et al.*, 1996)。最新研究表明,微孢子虫的线粒体已经减缩成形态结构和生化代谢简单的纺锤剩体(mitosome)。纺锤剩体是一类存在于某些单细胞真核生物中的由双层膜包裹,结构简单的线粒体同源细胞器,不具有三羧酸循环、氧化磷酸化等线粒体的典型功能。微孢子虫是严格的细胞内生长和繁殖,很难采用生化方法研究其细胞内代谢途径,因而关于微孢子虫完成生长和增殖的能量来源研究一直是研究的热点和难点(Keeling, 2009)。由于微孢子虫纺锤剩体不具有独立的基因组,所有的纺锤剩体蛋白是细胞核内的基因组编码,蝗虫微孢子虫 *Antonospora locustae*、兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi*(Katinka *et al.*, 2001)、比氏肠道微孢子虫 *Enterocytozoon bieneusi*(Akiyoshi *et al.*, 2009)、蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*(Cornman *et al.*, 2009)和家蚕微孢子虫(Pan *et al.*, 2013)基因组序列的相继发布,为微孢子虫能量代谢途径研究提供了强有力的基础。

线粒体转运蛋白质家族(mitochondrial carrier family, MCF)通过促进各类可溶性物质在线粒体内膜两侧的流通,保证线粒体发挥正常生理功能,其转运底物涉及氧化磷酸化、三羧酸循环、尿素合成等多种代谢反应。线粒体产生的多余的 ATP 分子则通过线粒体 ADP/ATP 转运蛋白(ADP/ATP carrier protein)运出线粒体。该蛋白家族成员能够将细胞质中的 ATP 转运到质体、线粒体等细胞器膜内腔,同时专一地与细胞器内等量的 ADP 分子结合并转移到膜外释放(Klingenberg, 2008)。

Williams 等(2008)在蝗虫微孢子虫中发现 ADP/ATP 特异性线粒体转运蛋白(ADP/ATP-specific mitochondrial carrier protein)基因,采用酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 表达系统发现该蛋白保留保守的靶向信号,可以定位于酿酒酵母的线粒体;利用大肠杆菌 *Escherichia coli* 对该基因进行异源表达,发现该蛋白能够介导 α-^{32}P 标记的 ATP 向胞内输入,表明该转运蛋白具有交换 ATP 和 ADP 的功能。那么家蚕微孢子虫中是否存在搬运 ATP 的转运蛋白?基于此,本研究利用家蚕微孢子虫基因组数据并结合已公布的微孢子虫基因组数据(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/),鉴定了家蚕微孢子虫的 ADP/ATP 转运蛋白及其定位情况,为控制和防治家蚕微粒子病提供理论基础。

1　材料和方法

1.1　家蚕微孢子虫的分离与培养

家蚕微孢子虫以 1×10^8 个/L 涂布于桑叶上,

自然晾干后添食 3 龄起蚕。于 5 龄第 7 天收集病蚕丝腺或中肠,用匀浆器研磨,加 0.9% 的生理盐水,5 层纱布过滤,滤液在 4℃下 300 r/min 和1 000 r/min 差速离心,多次重复得到粗提液。粗提液采用细胞分离液 Percoll 进行密度梯度离心,30 000 r/min 离心 40 min 进行进一步纯化。纯化得到的微孢子虫经生理盐水充分离心洗涤,最后收集底层沉淀即为家蚕微孢子虫,用 0.9% 的生理盐水悬浮,4℃保存。

1.2 载体与菌株

原核表达载体:pUC57 载体(GeneScript 公司);pQE40 载体购买于 Qiagen 公司;pET30a(+);菌株:*E. coli* Rosetta (DE3)。

1.3 主要试剂与仪器

丙烯酰胺、N,N′-亚甲双丙烯酰胺、SDS、DTT、β-巯基乙醇、甘氨酸、低分子量标准蛋白质、尿素和吐温 20 等购自上海生工;AEC 显色试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥公司;FITC 荧光标记羊抗鼠二抗、多聚赖氨酸、Triton X-100、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、DAPI、HRP 标记羊抗鼠二抗购自 Sigma 公司;彩色预染蛋白质分子量标准购自碧云天生物公司;PVDF 膜购自 Roche 公司;Ni-NAT 层析柱购自 Qiagen 公司。

1.4 ADP/ATP 转运蛋白基因的序列分析

采用在线网站 Expasy(http://expasy.org/)预测家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白基因开放阅读框,并翻译成蛋白质,预测其理论分子质量和等电点。跨膜域的预测为在线网站(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)和(http:// bioinfo.si.hirosaki-u.ac.jp/~ConPred2/)。采用 CLUSTALX 进行多重序列比对,最后用 Seaview 软件进行编辑(Larkin *et al*., 2007; Gouy *et al*., 2010)。

1.5 重组表达载体的构建

为了获得重组蛋白,根据蛋白跨膜域预测信息,选取 ADP/ATP carrier protein 去除跨膜结构域后留下的 3 段面向膜内侧的表位相连(第 1 段表位:KKETNLVIGKKESNLIIINKLK;第 2 段表位:YFMNKMMEKNFKKSLETVYIPNKTTSNIWKLLESRLLRN;第 3 段表位:KAVLYVNKKFQECQEKNTE-FDEEE)编码约 11 kD 的多肽,于金思特生物公司合成并克隆至 pUC。编码该多肽的核酸序列如下:

> NbNTT1-△TM CGagatctAAGAAAGAAACGAATTTAGTAATAGGAAAGAAAGAATCGAATTTAATAATAATAAACAAATTGAAATATTTATGAATAAAATGATGGAAAAGAATTTTAAAAAGAGTTTAGAGACGGTTTATATTCCAAATAAAACCACGAGTAATATCTGGAAATTATTAGAATCTCGTTTATTACGAAATAAGGCAGTTCTGTATGTCAATAAGAAGTTCCAGGAATGTCAAGAGAAGAATACGGAGTTTGATGAAGAGGAAgtcgac,利用 Primer Premier 5.0 设计基因的特异引物进行扩增,上游引物序列为 5′-CGagatctAAGAAAGAAACGAATTTAGT-3′,下游引物序列为 5′-gtcgacTTCCTCTTCATCAAACTCCG-3′,下划线为酶切位点。

合成的核苷酸序列由公司克隆至 pUC57 载体上,提取该质粒,用限制性内切酶 *Bgl* Ⅱ和 *Sal* Ⅰ进行双酶切,取双酶切验证正确的重组质粒对应的菌液送上海英骏公司进行核苷酸的测序。为了方便用于下一步研究,将该段序列构建至含有二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)标签融合表达标签的 pQE40 载体中,再用限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ和 *Sal* Ⅰ将融合序列剪切,获得含有 DHFR 标签的重组序列(约 984 bp),连接至 pET30a(+)载体中(NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a)进行诱导表达。

1.6 重组蛋白的诱导表达与纯化

提取测序正确的重组表达质粒 NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a,转化大肠杆菌 *E. coli* Rosetta 感受态细胞,挑取单菌落 37℃摇床中振荡培养,至 OD_{600} 约为 0.5~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续培养 3~5 h 后,取 1 mL 菌液至离心管中,12 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,收集菌体,以空载质粒诱导作对照,进行 SDS-PAGE 电泳检测。融合蛋白用纯化采用 Ni-NTA 柱亲和层析。将收集的洗脱液用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯化情况。

1.7 多克隆抗体制备及 Western blotting 分析

经亲和层析的融合蛋白免疫昆明小鼠,每头小鼠约注入 10 μg 重组蛋白。4 次免疫后的第 7 天摘除眼球采血,采集血液先放入 37℃静置处理 1 h,后置于 4℃过夜,吸取血清后小管分装,于 -20℃保存备用。

家蚕微孢子虫总蛋白的提取按照玻璃珠破碎法进行。经 SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上,以 1∶500体积比稀释的抗血清作为一抗,1∶500 (v/v) HRP 标记的羊抗鼠抗体作为二抗进行孵育,最后显色。

1.8 ADP/ATP 转运蛋白的间接免疫荧光定位

参照 Li 等(2009)进行。用 1% Triton X-100 处理纯化的成熟孢子 5 min,一抗工作浓度为1∶200(v/v),37℃温育 40 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;稍干后滴

加二抗 FITC-IgG（工作浓度 1∶64，v/v），37℃温育 40 min；洗涤同上；滴加 DAPI 室温染色 20 ~ 30 min；洗涤同上；于奥林巴斯荧光显微镜 BX53 观察。

2　结果

2.1　家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白序列分析

采用 BLAST 搜索家蚕微孢子虫基因组数据，获得一编码 ADP/ATP 转运蛋白的基因 *ADP/ATP carrier*（GenBank 登录号：EOB13854.1）。该基因全长 1 524 bp，编码蛋白含有 507 个氨基酸残基，预测分子质量为 59 kDa，等电点为 9.35。结构域预测显示，NbADP/ATP 含有 TLC 结构域和 12 个跨膜域。在 NCBI 网站上采用 BLASTP 进行分析，与微孢子虫的核酸转运蛋白氨基酸序列一致性为：与蜜蜂微孢子虫 NcADP/ATP 为 30%，与兔脑炎微孢子虫 EcADP/ATP3，EcADP/ATP1，EcADP/ATP4 和 EcADP/ATP2 分别为 29%，26%，25% 和 26%。为了进一步分析该蛋白的保守性，我们下载了兔脑炎微孢子虫、蝗虫微孢子虫、蜜蜂微孢子虫、酿酒酵母和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 ADP/ATP 转运蛋白，采用 Clustalx 进行多重序列比对分析。拟南芥及其他物种中的保守功能位点为 Lys^{155}，Glu^{245}，Glu^{385} 和 Lys^{527}（图 1），家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白保守功能位点为：Lys^{61}，Glu^{158}，Asp^{292} 和 Lys^{446}，尽管功能保守位点 Lys^{385} 在家蚕微孢子虫的

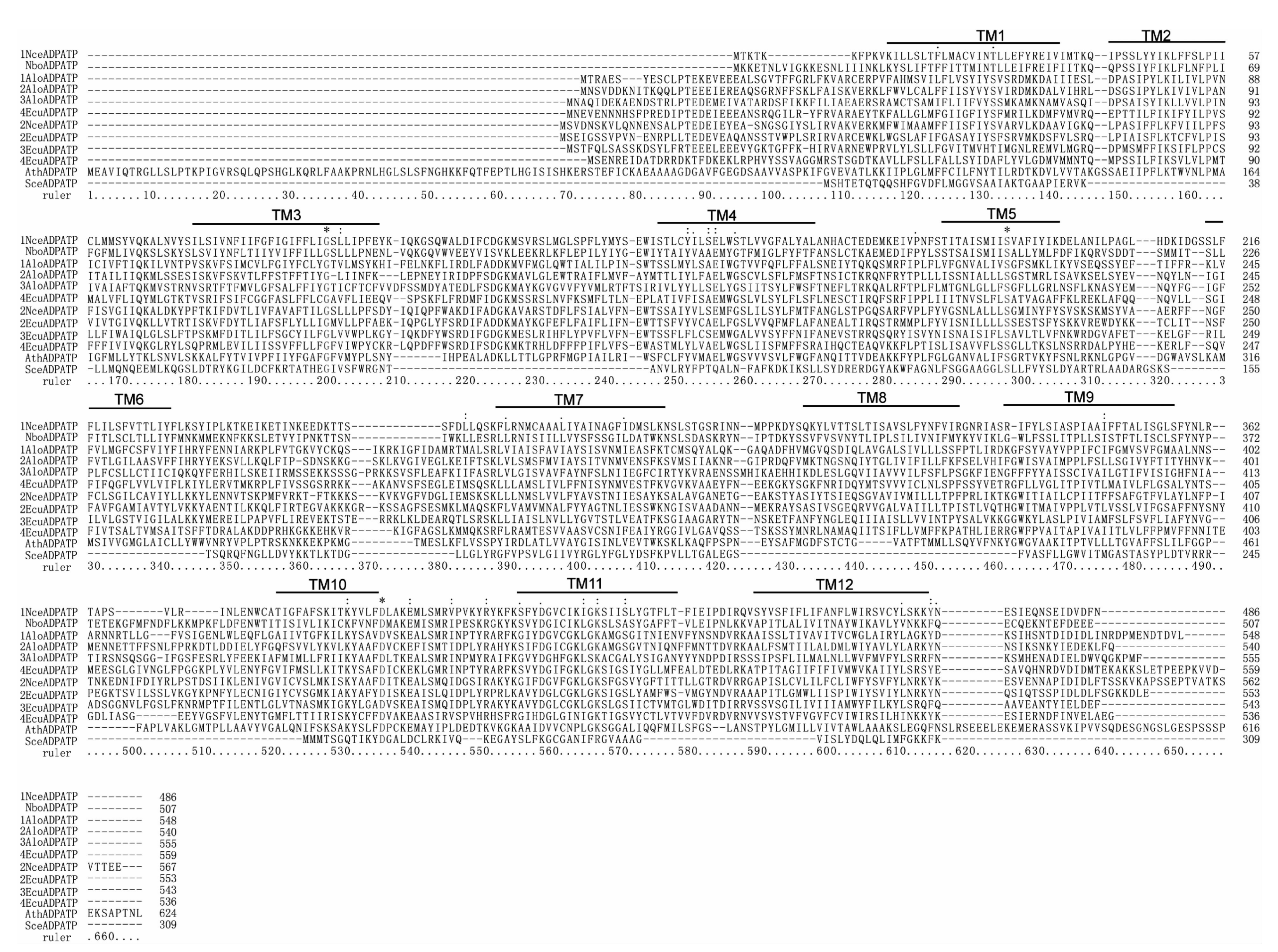


图 1　家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白与其同源蛋白的氨基酸序列多重比对

Fig. 1　Amino acid sequence alignment of the ADP/ATP carrier protein of *Nosema bombycis* with its homologous proteins

蛋白序列来源及 GenBank 登录号分别为 The origin of protein sequences and their GenBank accession numbers：Nce：蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*，XP_002996543；Nbo：家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*，EOB13854.1；Alo：蝗虫微孢子虫 *Antonospora locustae*（1Alo：ALO_886g1693；2Alo：ALO_886g1694；3Alo：ALO_886g1695）；Ecu：兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi*（1Ecu：NP_586157；2Ecu：NP_586167；3Ecu：NP_586169；4Ecu：NP_597260）；Ath：拟南芥 *Arabidopsis thaliana*，P92935；Sce：酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*，NP_013772.1. 横线区域为跨膜域部分，用 TM1 – TM12 表示；蓝色部分为在拟南芥中被验证的有功能的保守位点；红色部分为保守的氨基酸。Predicted transmembrane domains in the NbADP/ATP carrier protein are labeled with black line and represented as TM1 – TM12，amino acids in blue show sites proven to be critical for *A. thaliana* ADP/ATP protein，while those in red show conserved sites.

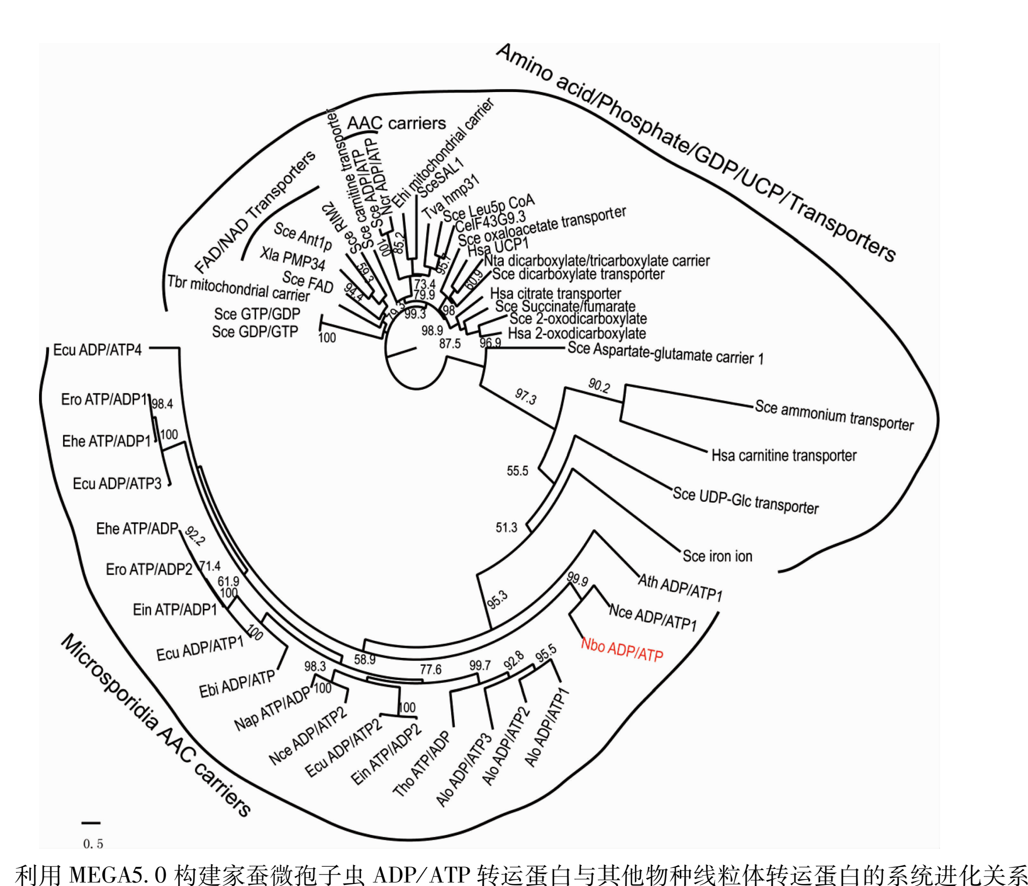


图 2　利用 MEGA5.0 构建家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白与其他物种线粒体转运蛋白的系统进化关系

Fig. 2　Phylogenetic relationship of the *Nosema bombycis* ADP/ATP carrier protein to other mitochondrial carrier protein sequences using MEGA5.0

Alo：蝗虫微孢子虫 *Antonospora locustae*；Ath：拟南芥 *Arabidopsis thaliana*；Cel：秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*；Ebi：比氏肠道微孢子虫 *Enterocytozoon bieneusi*；Ecu：兔脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi*；Ehe：海伦脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon hellem*；Ehi：溶组织阿米巴 *Entamoeba histolytica*；Ein：肠脑炎微孢子虫 *Encephalitozoon intestinalis*；Ero：*Encephalitozoon romaleae*；Hsa：人 *Homo sapiens*；Nap：西方蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis*；Nbo：家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*；Nce：东方蜜蜂微孢子虫 *Nosema ceranae*；Ncr：粗糙脉胞菌 *Neurospora crassa*；Sce：酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*；Nta：烟草 *Nicotiana tabacum*；Tbr：布氏锥虫 *Trypanosoma brucei*；Tho：人气管普孢虫 *Trachipleistophora hominis*；Tva：阴道毛滴虫 *Trichomonas vaginalis*；Xla：非洲爪蟾 *Xenopus laevis*.

ADP/ATP 转运蛋白中为 Asp[292]，但对拟南芥转运蛋白 ADP/ATP 的功能研究表明，当 Lys[385] 突变为 Asp 时，ADP/ATP 仍具有转运 ATP 的功能（Trentmann *et al.*，2000）。另外，多重序列比对显示除了功能位点比较保守外，还有 6 个氨基酸在真菌和植物拟南芥中高度保守（图 1）。

系统进化分析发现，微孢子虫的 ADP/ATP 转运蛋白聚为一簇，推测微孢子虫的 ADP/ATP 转运蛋白具有共同的起源。其中家蚕微孢子虫与蜜蜂微孢子虫最为近缘；而真菌、寄生虫和人的氨基酸等转运体聚为一类。值得注意的是，微孢子虫的 ADP/ATP 转运蛋白并未与酿酒酵母的 ADP/ATP 转运蛋白聚在一起，而与拟南芥的较为近缘。结果暗示 ADP/ATP 转运蛋白与真核生物 ADP/ATP 的直系同源蛋白具有相似的功能。

2.2　表达载体的构建和鉴定

核苷酸片段为 255 bp（约 11 kDa）由公司合成并克隆至 pUC57 载体上，为了增加表位的免疫原性及易于 SDS-PAGE 电泳检测，经过 2 次亚克隆，将 DHFR（约 558 bp，26 kDa）标签加至目的序列前端，并构建了 NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a 重组质粒，双酶切检测到包含了 DHFR 的目的序列（图 3），进一步测序验证该序列正确。

2.3　重组蛋白的诱导表达与纯化

将构建成功的重组表达载体 NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a 转入 *E. coli* Rosetta 细胞中，用含 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基平板成功筛选出转化子。重组 Rosetta 菌经 IPTG 诱导后，用 12.5% SDS-PAGE 检测 NbADP/ATP-△TM-DHFR 的表达。结果显示（图5），在IPTG诱导后，与诱导

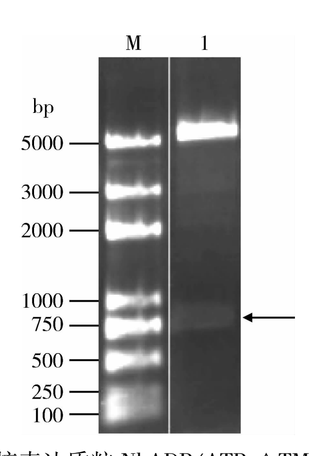


图 3 重组原核表达质粒 NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a 的双酶切验证

Fig. 3 Verification of recombinant plasmid NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a by double-enzyme digestion

M：DNA 标准分子量 Trans2K plus DNA marker；1：重组载体 NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a 的双酶切检测 Double-enzyme digested NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a recombinant plasmid.

前的重组菌相比，重组菌在相应的位置明显增加了一条表达量很高的蛋白带，其相对分子质量大小约 37 kD（图 4，泳道 2，红圈所示）。经超声波破碎处理后，大量的目的蛋白在超声破碎后的沉淀中（图 4，泳道 3），表明该重组蛋白主要以包涵体形式存在细胞中。用 Buffer B 抽提菌体中的包涵体，经 Ni-NTA 亲和层析柱获得重组蛋白。过亲和层析柱纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳检测，rNbADP/ATP-△TM-DHFR 蛋白条带较单一，箭头所示（图 4，泳道 4）能满足下一步实验。

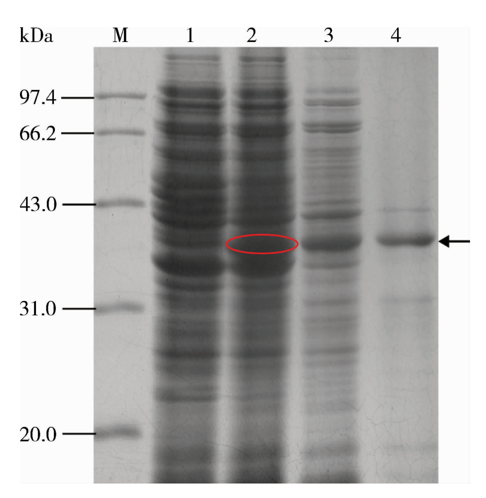


图 4 融合蛋白 rNbADP/ATP-△TM-DHFR 的诱导表达及纯化

Fig. 4 Induced expression and purification of fusion protein rNbADP/ATP-△TM-DHFR

M：蛋白质分子量标准物 Low molecular weight protein marker；1：重组菌 Rosetta-NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a 未经 IPTG 诱导 Rosetta-NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a without induction；2：重组菌 Rosetta-NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a 经 IPTG 诱导表达 Rosetta-NbADP/ATP-△TM-DHFR-pET30a with IPTG induction；3：重组蛋白 rNbADP/ATP-△TM-DHFR 的包涵体形式 The inclusion body of rNbADP/ATP-△TM-DHFR；4：重组蛋白 rNbADP/ATP-△TM-DHFR 经镍柱纯化 The purified fusion protein rNbADP/ATP-△TM-DHFR by Ni-NTA affinity chromatography.

2.4 Western blotting 及间接免疫荧光定位分析

采用玻璃珠破碎法提取家蚕微孢子虫的总蛋白，然后转移至 PVDF 膜，用 Anti-NbNTT1 抗体进行免疫杂交。Anti-NbADP/ATP 能特异性地与约 59 kDa 的蛋白质发生免疫反应（图 5）。

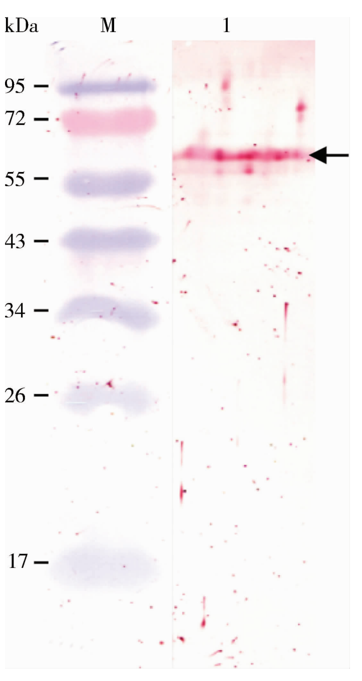


图 5 家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of ADP/ATP carrier protein of *Nosema bombycis*

为了确定家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白在家蚕微孢子虫中的分布特点，采用间接免疫荧光方法进行研究。经 Triton X-100 处理成熟孢子虫后，可以检测到卵圆形孢子周围分布着较强的绿色荧光信号（图 6：A），而未经 Triton X-100 处理的孢子或者阴性对照组中均未能检测到推测 ADP/ATP 转运蛋白可能定位于孢子质膜上，推测家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白可能是参与搬运宿主细胞能量的蛋白。

3 讨论

微孢子虫是严格的细胞内生长和繁殖，很难采用生化方法研究其细胞内代谢途径，因而关于微孢

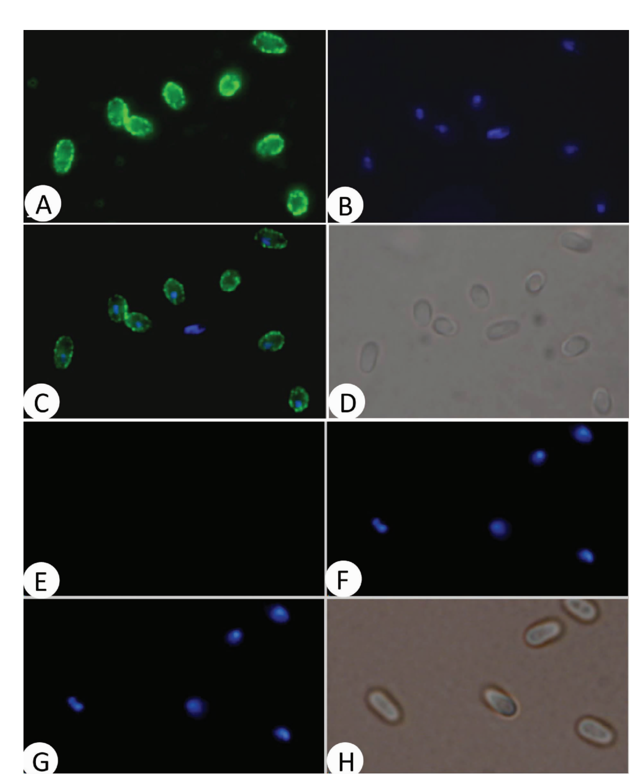


图 6　家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白的间接免疫荧光定位

Fig. 6　Cellular localization of the *Nosema bombycis* ADP/ATP carrier protein detected by immunofluorescence

A：用抗 NbADP/ATP 蛋白的抗体作为一抗、FITC 标记的羊抗鼠抗体为二抗，与纯化的家蚕微孢子虫孵育，在孢子周围检测到翠绿色荧光 Purified mature spores are visualized with a fluorescence microscope, after incubation with the primary antibodies against NbADP/ATP, and green fluorescence was detected around the spores; B, F：用 DAPI 染孢子的细胞核 Purified spores were stained by DAPI; C：图 A 和 B 的叠加 Merged image of pictures A and B; D, H：相差视野下家蚕微孢子虫 Purified spores in white light; E：用阴性血清和 FITC 标记的羊抗鼠抗体与纯化的家蚕微孢子虫孵育，未能检测到荧光信号分布 Purified spores incubated with the negative serum as the control, and no fluorescence signal was found; G：图 E 和 F 的叠加 Merged image of pictures E and F.

子虫完成生长和增殖的能量来源研究一直是研究的热点和难点。通常，人们认为厌氧的和微量需氧的生物缺乏线粒体。某些寄生虫如肠贾第虫 *Giardia lamblia*、阴道毛滴虫 *Trichomonas vaginalis*、阿米巴原虫 *Entamoeba histolytica* 和微孢子虫门（Microsporidia）是在线粒体内共生事件之前分化而来的，因而认为它们也是无线粒体的。近期免疫电镜观察发现，这些貌似无线粒体生物含有一些不易观察、高度减缩的由线粒体衍生的细胞器，即纺锤剩体或过氧化氢体。目前已相继在人气管普孢虫 *Trachipleistophora hominis*（Williams *et al.*, 2002）、兔脑炎微孢子虫 *E. cuniculi*（Tsaousis *et al.*, 2008）和蝗虫微孢子虫 *A. locustae*（Williams *et al.*, 2008）等微孢子中鉴定到纺锤剩体。尽管纺锤剩体高度减缩，不能进行 ATP 合成，不能进行底物水平磷酸化。但兔脑炎微孢子虫和人气管普孢虫的纺锤剩体仍保留了组装铁硫簇的功能（Mi-Ichi *et al.*, 2009）。然而线粒体内的许多反应诸如代谢物的跨膜运输是依靠线粒体型转运蛋白家族（mitochondrial carrier family, MCF）来实现的。比如，阿米巴原虫和阴道毛滴虫的 MCF 蛋白虽然不属于典型的 ADP/ATP 转运蛋白，但仍可以吸收 ATP（Tjaden *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005）。随着多种微孢子虫基因组序列的相继公布，许多微孢子虫都含有多个核苷转运体蛋白。Williams 等（2008）发现蝗虫微孢子虫 ADP/ATP 特异性线粒体转运蛋白可以靶向酿酒酵母的线粒体，并能介导 α-^{32}P 标记的 ATP 向胞内的输入。兔脑炎微孢子虫不具有线粒体转运蛋白，但其基因组编码 4 个 ADP/ATP 转运蛋白：EcADP/ATP1, EcADP/ATP2, EcADP/ATP3 和 EcADP/ATP4，系统进化、底物结合和亚细胞定位等研究表明 EcADP/ATP 水平转移来自胞内寄生的细菌立克次氏体或衣原体，EcADP/ATP 能够与多种能量分子结合，其中 EcADP/ATP3 靶向纺锤剩体转运细胞质的能量进入纺锤剩体，EcADP/ATP1, EcADP/ATP2 和 EcADP/ATP4 定位于细胞质膜，可能转运宿主细胞的能量为寄生生活所用（Tsaousis *et al.*, 2008）。这些研究结果暗示，微孢子虫纺锤剩体利用核苷转运蛋白从细胞质中获得能量分子。

生物信息学分析表明，家蚕微孢子虫基因组含有一个 ADP/ATP carrier protein，理论分子量为 59 kDa。该蛋白预测含有 12 个跨膜结构域，是一典型的膜蛋白。我们选取 3 个暴露于膜外部分的表位，合成相应含有 255 个碱基的核酸序列。由于序列较短，需引入标签以增加免疫原性。DHFR 自身在小鼠和兔中几乎没有免疫原性，而且 DHFR 可提高外源蛋白表达的稳定性和抗原性。基于此，我们采用克隆的方法在合成的核酸序列前端加入 DHFR 标签。原核诱导表达显示该蛋白表达量较高。将经 Ni-NAT 亲和层析柱纯化的重组蛋白免疫小鼠，获得了相应的抗血清 Anti-NbADP/ATP。免疫印迹结果显示，该抗体可以与家蚕微孢子虫总蛋白中特异的，分子量大小与理论分子量 59 kDa 基本一致的蛋白质条带进行杂交反应，表明所制备的抗血清可以识别 NbADP/ATP，也证明了 DHFR 标签不影响后续的间接免疫荧光定位实验。对成熟孢子进行透化处

理，间接免疫荧光标记后，在孢子虫周围可以检测到绿色荧光信号分布，表明家蚕微孢子虫 ADP/ATP 转运蛋白定位于家蚕微孢子虫细胞质膜上，可能是家蚕微孢子虫在胞内寄生过程中，获得宿主细胞的能量分子的方式之一，为自身增殖所需。Dagley 等(2009)通过向蜜蜂饲喂 ADP/ATP 转运蛋白的双链 RNA(dsRNA)，利用 RNAi 降低孢质膜定位的 ADP/ATP 转运蛋白的转录水平，从而可以减低蜜蜂微孢子虫的感染率，说明孢质膜定位核苷转运蛋白具有重要的作用。因此，本研究对家蚕微孢子虫 NbADP/ATP 转运蛋白的定位研究将为阻断微孢子虫能量来源，达到控制和防治家蚕微粒子病提供新的思路。

参考文献（References）

Akiyoshi DE, Morrison HG, Lei S, Feng XC, Zhang QS, Corradi N, Mayanja H, Tumwine JK, Keeling PJ, Weiss LM, Tzipori S, 2009. Genomic survey of the non-cultivatable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS Pathogens*, 5(1): e1000261.

Bui ET, Bradley PJ, Johnson PJ, 1996. A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(18): 9651 – 9656.

Chan KW, Slotboom DJ, Cox S, Embley TM, Fabre O, Giezen M, Harding M, Horner DS, Kunji ERS, León-Avila G, Tovar J, 2005. A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. *Current Biology*, 15(8): 737 – 742.

Cornman RS, Chen YP, Schatz MC, Street C, Zhao Y, Desany B, Egholm M, Hutchison S, Pettis JS, Lipkin WI, Evans JD, 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathogens*, 5(6): e1000466.

Dagley MJ, Dolezal P, Likic VA, Smid O, Purcell AW, Buchanan SK, Tachezy J, Lithgow T, 2009. The protein import channel in the outer mitosomal membrane of *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 26(9): 1941 – 1947.

Didier ES, Maddry JA, Brindley PJ, Stovall ME, Didier PJ, 2005. Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert Reviews*, 3(3): 419 – 434.

Embley TM, Hirt RP, 1998. Early branching eukaryotes? *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(6): 624 – 629.

Franzen C, 2008. Microsporidia: a review of 150 years of research. *Open Parasitology Journal*, 2: 1 – 34.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O, 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2): 221 – 224.

Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretaillade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, Alaoui HE, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivares CP, 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414(6862): 450 – 453.

Keeling PJ, 2009. Five questions about microsporidia. *PLoS Pathogens*, 5(9): e1000489.

Klingenberg M, 2008. The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1778(10): 1978 – 2021.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947 – 2948.

Li YH, Wu ZL, Pan GQ, He WW, Zhang RZ, Hu JH, Zhou ZY, 2009. Identification of a novel spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis*. *International Journal for Parasitology*, 39(4): 391 – 398.

Mi-Ichi F, Yousuf MA, Nakada-Tsukui K, Nozaki T, 2009. Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(51): 21731 – 21736.

Nageli KW, 1857. Uber die neue krankheit der seidenraupe und verwandte organismen. *Bot. Z.*, 15: 760 – 761.

Pan GQ, Xu JS, Li T, Xia QY, Liu SL, Zhang GJ, Li SG, Li CF, Liu HD, Yang L, Liu T, Zhang X, Wu ZL, Fan W, Dang XQ, Xiang H, Tao ML, Li YH, Hu JH, Li Z, Lin L, Luo J, Geng LN, Wang LL, Long MX, Wan YJ, He NJ, Zhang Z, Lu C, Keeling PJ, Wang J, Xiang ZH, Zhou ZY, 2013. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics*, 14(1): 186.

Scheid P, 2007. Mechanism of intrusion of a microspordian-like organism into the nucleus of host amoebae (*Vannella* sp.) isolated from a keratitis patient. *Parasitology Research*, 101(4): 1097 – 1102.

Tjaden J, Haferkamp I, Boxma B, Tielens AGM, Huynen M, Hackstein JHP, 2004. A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an independent origin of these organelles. *Molecular Microbiology*, 51(5): 1439 – 1446.

Trentmann O, Decker C, Winkler HH, Neuhaus HE, 2000. Charged amino acid residues in transmembrane domains of the plastidic ATP/ADP transporter from *Arabidopsis* are important for transport efficiency, substrate specificity, and counter exchange properties. *European Journal of Biochemistry*, 267(13): 4098 – 4105.

Tsaousis AD, Kunji ERS, Goldberg AVG, Lucocq JM, Hirt RP, Embley TM, 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 453(7194): 553 – 556.

Williams BAP, Haferkamp I ,Keeling PJ, 2008. An ADP/ATP-specific mitochondrial carrier protein in the microsporidian *Antonospora locustae*. *Journal of Molecular Biology*, 375(5): 1249 – 1257.

Williams BAP, Hirt RP, Lucocq JM, Embley TM, 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature*, 418(6900): 865 – 869.

（责任编辑：赵利辉）